

Institut für Veterinärbakteriologie  
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. M. M. Wittenbrink

Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. R. Hoop

**Aviäre Influenza:  
molekularbiologische Untersuchung  
von Wildvögeln und Seroscreening  
von Wirtschaftsgeflügel  
in der Schweiz**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

**Anette Monika Baumer**

Tierärztin  
von Schaffhausen (SH)

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. R. Hoop, Referent

PD Dr. M. Engels, Korreferentin

Zürich 2005

## **Meinen Eltern**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>A. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>B. Literaturübersicht</b>	<b>2</b>
B.1. Definitionen HPAI/LPAI	2
B.2. Geschichte	2
B.3. Aetiologie	4
B.4. Epidemiologie	4
B.5. Klinik	5
B.6. Diagnose	5
<b>C. Material und Methoden</b>	<b>7</b>
C.1. Referenzviren	7
C.1.2. Anzüchtung von Referenzviren	7
C.2. Probenmaterial PCR	7
C.2.1. Kloakentupfer, Kotproben und Organe	7
C.3. Probenaufbereitung und RNA-Extraktion	10
C.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)	11
C.4.1. Vorversuche	11
C.4.2. One-step real-time RT-PCR	12
C.4.3. Klassische RT-PCR	13
C.5. DNA-Sequenzierung	14
C.6. Anzüchtung auf Bruteiern	14
C.7. Probenmaterial für die serologische Untersuchung	14
C.7.1. ELISA	14
C.7.2. Hämagglutinationshemmungs-Test	14
<b>D. Resultate</b>	<b>16</b>
D.1. PCR	16
D.1.1. One-step Realtime RT-PCR	16

D.1.2.	Klassische RT-PCR	17
D.2.	DNA-Sequenzierung	20
D.3.	Anzüchtung auf Bruteiern	20
D.4.	Serologische Untersuchung	20
D.4.1.	ELISA	20
D.4.2.	Hämagglutinationshemmungs-Test	20
<b>E.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>21</b>
E.1.	PCR	21
E.2.	Serologie	23
<b>F.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>24</b>
<b>G.</b>	<b>Summary</b>	<b>25</b>
<b>H.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>26</b>

## Abkürzungsverzeichnis:

AIV	Aviäres Influenza Virus
AGID	Agargel-Immundiffusion
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMEM	eagle minimum essential medium
EU	Europäische Union
HA	Hämagglutination
HAH	Hämagglutinationshemmung
HAT	Hämagglutinationstest
HHT	Hämagglutinationshemmungs-Test
HPAI	highly pathogenic avian influenza
IU	international units
IVPI	intravenöser Pathogenitätsindex
Kbp	Kilobasenpaar
LPAI	low pathogenic avian influenza
M	Molar, Mol pro Liter
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pg	Picogramm
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkription mit nachfolgender PCR
SIV	Schweine Influenza Virus
SPF	specific pathogen free
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermophilus Aquaticus

## Einleitung

### **A. Einleitung**

Die Aviäre Influenza, auch klassische Geflügelpest genannt, ist eine hochansteckende Krankheit der Hühnervögel, die grosse Verluste in der Geflügelindustrie verursachen kann. Das letzte Mal ist in der Schweiz in den 30er Jahren ein Fall aufgetreten, und seit damals ist sie amtlich anerkannt frei.

Die Wildvögel gelten als das Virusreservoir der AIV. Vor allem Wasservögel sind Träger des Virus. Für diese ist das Virus in der Regel apathogen, sie verbreiten es via Faeces in ihrem Habitat und während dem Vogelzug entlang ihrer Flugrouten.

In der Schweiz sind bis anhin keine Untersuchungen von Wildvögeln auf aviäre Influenza durchgeführt worden. In Freilandhaltung besteht besonders für Wirtschaftsgeflügel ein erhöhtes Infektionsrisiko (ca. 30% der Schweizer Betriebe), wegen eines möglichen Kontaktes zu Wildvögeln.

Die Ziele dieser Arbeit bestehen darin, die Prävalenz des Virus in Wildvögeln und ausgewähltem Nutzgeflügel zu bestimmen und molekularbiologische Tests für den Nachweis von AIV zu etablieren.

## B. Literaturübersicht

### B.1. Definitionen HPAI/LPAI

Der Ausdruck highly pathogenic avian influenza (HPAI) weist auf virulente Virusstämme hin. Ein Influenza Virus wird als HPAI Virus klassiert, wenn es letal ist für vier- bis achtwöchige empfängliche Hühner. Aus dieser Gruppe von acht Tieren müssen sechs oder mehr Tiere innerhalb zehn Tagen nach einer intravenösen Inokulation von 0.2 ml infektiöser Allantoisflüssigkeit sterben.

Der intravenöse Pathogenitätsindex (IVPI) ist eine weitere Definition für die HPAI. Zehn 6-wöchigen SPF Tieren wird infektiöse Allantoisflüssigkeit intravenös injiziert. Während den zehn folgenden Tagen werden diese Tiere in 24 h Intervallen klinisch untersucht und ihr Krankheitsgrad wird von 0 (normal) bis 3 (tot) beurteilt. Nach dem Ablauf dieser Frist wird ein Durchschnittswert für die verschiedenen Tiere erhoben und dies ist dann der IVPI.

Alle AIV Isolate, die weder H5 bzw. H7 Subtypen sind, noch für Geflügel virulent sind, werden als low pathogenic avian influenza (LPAI) Viren bezeichnet. H5 und H7 Subtypen, die bei der Hämagglutinin-Spaltungsstelle eine Aminosäuresequenz haben, die bei keinem HPAI Virus nachgewiesen werden konnte, zählen auch zu den LPAI Subtypen. Das Oberflächenprotein Hämagglutinin muss proteolytisch gespalten werden, damit eine Infektion stattfinden kann. (OIE, 2004).

### B.2. Geschichte

Die hochansteckende Form der aviären Influenza, HPAI oder auch klassische Geflügelpest genannt, wurde als eine der ersten viralen Geflügelkrankheiten durch den Italiener Perroncito 1878 beschrieben (Perroncito, 1878). Er beschreibt eine Krankheit, welche die Geflügelbestände rund um Turin mit milden klinischen Symptomen befallen hatte, die sich dann aber in eine pathogenere Form verwandelte und praktisch die ganze Geflügelpopulation der Umgebung auslöschte.

Bis heute haben HPAI-Ausbrüche immer wieder für gravierende Verluste in der Geflügelindustrie gesorgt. Seit der Entdeckung zweier hochpathogener Subtypen (H5 und H7) 1959 wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Ausbrüche beobachtet. Die erste Isolierung erfolgte 1961 aus einer Seeschwalbe (A/tern/S.Africa/61; H5N3). Erst in den siebziger Jahren erkannte man die eigentliche Bedeutung der Wildvögel als Virusreservoir (Alexander 2000).

**Tabelle 1:** HPAI Isolate aus Nutzgeflügel, modifiziert nach Alexander (2000) und promedmail

Virus Typ	Subtyp	Spezies	Land	Jahr
A	H5N1	Huhn	Schottland	1959
A	H7N3	Pute	England	1963
A	H5N9	Pute	USA (Ontario)	1966
A	H7N7	Huhn	Australien (Victoria)	1976

## Literaturübersicht

A	H7N7	Huhn	Deutschland	1979
A	H7N7	Pute	England	1979
A	H5N2	Huhn	USA (Pennsylvania)	1983
A	H5N8	Pute	Irland	1983
A	H7N7	Huhn	Australien (Victoria)	1985
A	H5N1	Pute	England	1991
A	H7N3	Huhn	Australien (Victoria)	1992
A	H7N3	Huhn	Australien (Queensland)	1994
A	H5N2	Huhn	Mexiko	1994
A	H7N3	Huhn	Pakistan	1997
A	H7N4	Huhn	Australien	1997
A	H5N1	Huhn	Hong Kong	1997
A	H5N2	Huhn	Italien	1997
A	H7N1	Pute	Italien	1999
A	H5N1	Ente	Hong Kong	2001
A	H5N1	Ente	Hong Kong	2002
A	H7N3	Huhn	Chile	2002
A	H5N1	Huhn	Hong Kong	2003
A	H7N2	Huhn	USA (Connecticut)	2003
A	H7N7	Huhn	Holland, Belgien, Deutschland	2003
A	H5N1	Huhn, Ente	Versch. Länder in Südostasien	2003 2004 2005

Im Februar und März 1999 trat im Nordosten von Italien ein LPAI-Virus vom Subtyp H7N1 mit einem intravenösen Pathogenitätsindex (IVPI) von 0.0-0.19 bei Truten auf. Mitte Dezember mutierte das Virus zur HPAI Form mit sehr hoher Mortalität.

Das Virus breitete sich über sechs Provinzen aus und über 15 Mio. Vögel wurden gekeult (über 400 Ausbrüche). Nach diesem Ausbruch impften die Tierhalter die Trutenbestände der betroffenen Gegend mit inaktiviertem Impfstoff (H7N3) (Capua et al., 2002).

Im Juni, Juli und später im Oktober 2002 kam es in der gleichen Region zu mehreren LPAI-Ausbrüchen durch H7N3 bei Truten und Hühnern. Auch diesmal wurden betroffene Herden getötet (200 Ausbrüche). Die Impfstrategie wurde zusammen mit erhöhten Biosicherheitsmassnahmen weiterentwickelt (Zanella, 2003).

Im Frühling 2003 trat HPAI (H7N7) in holländischen, belgischen und deutschen Geflügelbeständen auf. Allein in den Niederlanden mussten über 28 Mio. Tiere gekeult werden (252 Ausbrüche). In Belgien gab es acht Ausbrüche und in Deutschland einen ([www.promedmail.org](http://www.promedmail.org)).



## Literaturübersicht

Die Herkunft des Virus ist wahrscheinlich auf ein Reassortment von zwei verschiedenen Virussubtypen zurückzuführen. Der ‚neue‘ Subtyp (H7N7) wurde zuerst in Hühnern einer Freilaufhaltung entdeckt. Die klinischen Symptome waren nicht typisch: es gab praktisch keine respiratorischen Symptome. Es wurden nur geringgradige Kopfschmerzen und beinahe keine subkutanen Blutungen beobachtet. Die Legeleistung und der Allgemeinzustand waren sehr schlecht, die Mortalität sehr hoch (bis zu 100%). In der Sektion wurde Tracheitis und eine geringe Organschwellung diagnostiziert (Elbers et al., 2004).

In den übrigen EU-Staaten und in der Schweiz sind in den letzten fünf Jahren keine Fälle von HPAI aufgetreten.

Wegen einer HPAI-Epidemie (H5N1) wurden seit Dezember 2003 in zehn südasiatischen Ländern (China, Indonesien, Japan, Kambodscha, Laos, Malaysia, Nord Korea, Süd Korea, Thailand und Vietnam) über 100 Millionen Vögel getötet. Obschon für den Menschen normalerweise keine Infektionsgefahr durch AIV besteht, konnte dieser Subtyp (H5N1) die Speziesbarriere überschreiten. Am schlimmsten betroffen waren Thailand, Vietnam und Kambodscha, wo 52 Menschen starben ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).

### **B.3. Aetiologie**

Die aviäre Influenza wird durch Influenzaviren des Typs A aus der Familie der Orthomyxoviridae verursacht. Es existieren zahlreiche Subtypen, die anhand zweier Oberflächenproteine eingeteilt werden, des Hämagglutinins mit 16 Subtypen und der Neuraminidase mit 9 Subtypen. Diese Subtypen kommen in allen Kombinationen vor, hauptsächlich das Wassergeflügel beherbergt viele der verschiedenen Varianten. Die H5 und H7 Subtypen haben sich als pathogenste erwiesen. Sie sind für alle bisher beobachteten HPAI-Ausbrüche verantwortlich und haben zum Teil zoonotisches Potential.

Die Tenazität des Virus ist nicht sehr hoch. Inaktivierung erfolgt durch Hitze (60°C, 30 min), Trockenheit, ultraviolettes Licht und gängige Desinfektionsmittel ([www.oie.int](http://www.oie.int)). Bei kühlen Temperaturen kann das Virus in Faeces und Wasser länger überleben (4°C, 30-35 Tage) (Swayne, 2000).

### **B.4. Epidemiologie**

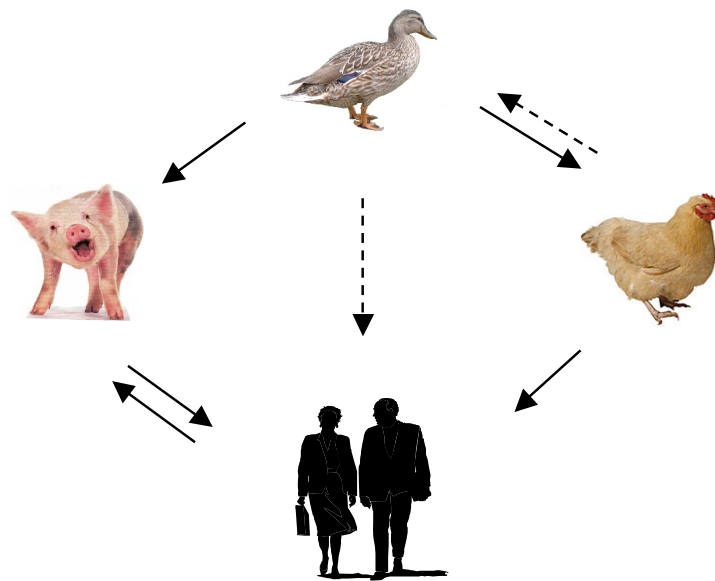
Um die Speziesbarriere überwinden zu können, muss sich das Influenzavirus anpassen. Dies geschieht einerseits durch Genaustausch (shift) zwischen verschiedenen Subtypen, andererseits können Punktmutationen (drift) an bestimmten Stellen des Genoms neue Virusvarianten hervorbringen. Ergebnisse aus molekularepidemiologischen und phylogenetischen Studien zeigen, dass insbesondere Wasservögel ein wichtiges Reservoir für den viralen Genpool bilden, in dem der beschriebene Genaustausch stattfinden kann.

Auf diese Weise neu entstandene Influenzaviren können bei Vogelzügen über weite Strecken ausgebreitet werden und so andere Spezies infizieren (Werner & Globig, 2004). Die Übertragung des Virus erfolgt direkt durch Kontakt, via Faeces oder indirekt via Futter, Trinkwasser, Gerätschaften und Kleidung.

## Literaturübersicht

Es gibt Hinweise dafür, dass das Schwein beim Wirtswechsel des Virus vom Vogel auf den Menschen eine entscheidende Rolle spielt. Es wird in diesem Zusammenhang von einem „mixing vessel“ gesprochen. Da Wildenten, Hausgeflügel und Schweine in Südchina in engem Kontakt mit den dortigen Bauern leben, wird der Austausch zwischen den Spezies einfacher und dies ist auch der Grund, warum Influenza-Epidemien häufig aus diesem Raum kommen (Rott, 1997).

**Abb. 1)** Übertragungswege des aviären Influenzavirus, modifiziert nach Alexander (2000).



### B.5. Klinik

Als Symptome zeigen die Tiere massiven Rückgang der Legeleistung, Rhinitis, Sinusitis, Kopf- und Halsödeme und Zyanose der unbefederten Haut (Alexander, 2000). Je nach Pathogenität des Virus steigen die Morbidität und die Mortalität stark an.

Pathologische Befunde sind Dehydrierung, Petechien auf inneren Organen und Muskeln, subkutane Ödeme im Kopf- und Halsbereich, gestaute Nieren und muköses Exsudat im Lumen der Trachea und in den Nasenhöhlen ([www.oie.int](http://www.oie.int)).

### B.6. Diagnose

Für den Virusnachweis werden Kloaken- oder Luftröhrentupfer von kranken oder Organproben von verendeten Tieren verwendet. Neben dem Anzüchtungsversuch im embryonierten Brutei oder in der Zellkultur sind in den letzten Jahren molekulare Nachweismethoden zu diagnostischen Zwecken erfolgreich validiert worden.

Die umfassende Antigentypisierung erfolgt via Polymerasekettenreaktion (PCR). Die PCR ist ein spezifisches und sensitives Nachweisverfahren für die aviäre Influenza (van Elden et al., 2001).

## Literaturübersicht

Für den Antikörpernachweis werden Verfahren wie Hämagglutinationshemmung, Agargel-Immundiffusion (AGID) und enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) verwendet ([www.oie.int](http://www.oie.int)).

## **C. Material & Methoden**

### **C.1. Referenzviren**

Als Referenzstämme für die PCR dienten folgende Viren:

LPAI- Stämme: A/turk/Mass/65 (H6N2) 5120 HE/ml

A/ turk/Wis/66 (H9N2) 320 HE/ml

A/duck/Cz/56 (H4N6) 2560 HE/ml

Plasmid: A/duck/Ukraine/63 (H3N8), M-Gen im pCR®2.1-TOPO® Vektor (3.9 Kbp)

Für die serologischen Untersuchungen wurden folgende Virusstämme verwendet:

A/chicken/Scotl./59 (H5N1)

A/african starling/England-Q/983/7 (H7N1)

A/turkey/Ontario/77732/66 (H5N9)

Die Referenzstämme wurden uns freundlicherweise vom Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems, Deutschland und vom Veterinary Laboratories Agency (VLA) in Weybridge, England zur Verfügung gestellt.

#### **C.1.2. Anzüchtung von Referenzviren**

Die oben genannten Referenzvirusstämme wurden auf 9-11 Tage vorbebrütete Eier verimpft, indem 0.2 ml der Virussuspension in die Chorio-Allantoishöhle injiziert wurde.

Die beimpften Eier wurden weitere sechs Tage bebrütet und täglich kontrolliert. Nach einem Tag abgestorbene Eier wurden entsorgt (Impffehler). Die Allantoisflüssigkeit von später abgestorbenen Eiern wurde geerntet und im Hämagglutinationstest (HAT) mit einer 1%igen Hühnererythrozyten-Suspension nach Methodenbeschreibung vom Official Journal of European Countries getestet (No. L 260, Kapitel 5). Die Titer wurden anhand einer 2-fachen Verdünnungsreihe bestimmt und in hämagglutinierenden Einheiten (HE) pro ml ausgedrückt.

### **C.2. Probenmaterial PCR**

#### **C.2.1. Kloakentupfer, Kotproben und Organe**

479 Kloakentupfer wurden während der Beringungsaktionen (September bis November 2003) des basellandschaftlichen Natur- und Vogelschutzverbandes unter dem Patronat der Vogelwarte Sempach entnommen. Zudem konnten bei Findelenten des Tierheims Pfötli (2003 und 2004) in Winkel 87 Proben erhoben werden.

101 Kotproben wurden in einem wichtigen Rastgebiet für Zugvögel, dem Klingnauer Stausee, gesammelt, sowie entlang offener Gewässer in der Nachbarschaft von elf ausgewählten Geflügelbetrieben mit Freilandhaltung als auch in verschiedenen Vogelpflegestationen.

Beide Proben wurden mit kleinen Wattestäbchen entnommen und sofort in 1 ml Transportmedium verbracht (zu je einem Drittel EMEM, Kälberserum und Sörensenpuffer, der

## Material & Methoden

mit Antibiotika vermischt war (1 g Vancomycin, 1 g Streptomycin und 20 mg Garamycin pro Liter). Während des Transportes ins Labor wurden die Proben bei 4°C gekühlt und anschliessend, sofern nicht direkt weiterverarbeitet, bei –70°C aufbewahrt.

Zusätzlich wurde allen sezierten Vögeln ein Kloakentupfer entnommen. Die 322 toten Vögel stammten aus der Abteilung für Zoo-, Heim- und Wildtiere der Vetsuisse-Fakultät Zürich, aus dem Sektionsmaterial der Abteilung für Geflügel- und Kaninchenkrankheiten des Institutes für Veterinärbakteriologie, von der Vogelwarte Sempach und von verschiedenen Abschussaktionen der Jagdverwaltungen der Kantone Schaffhausen, Thurgau, Zürich, Zug, dem Flughafen Zürich-Kloten und des Taubenwartes der Stadt Zürich.

## Material & Methoden

Abbildung 2 zeigt die geographische Verteilung der insgesamt 989 Proben. Sie stammten mehrheitlich aus dem Schweizer Mittelland. Daneben sind drei wichtige Wasservogelrastplätze der Schweiz (nach Angaben der Vogelwarte Sempach) aufgeführt.

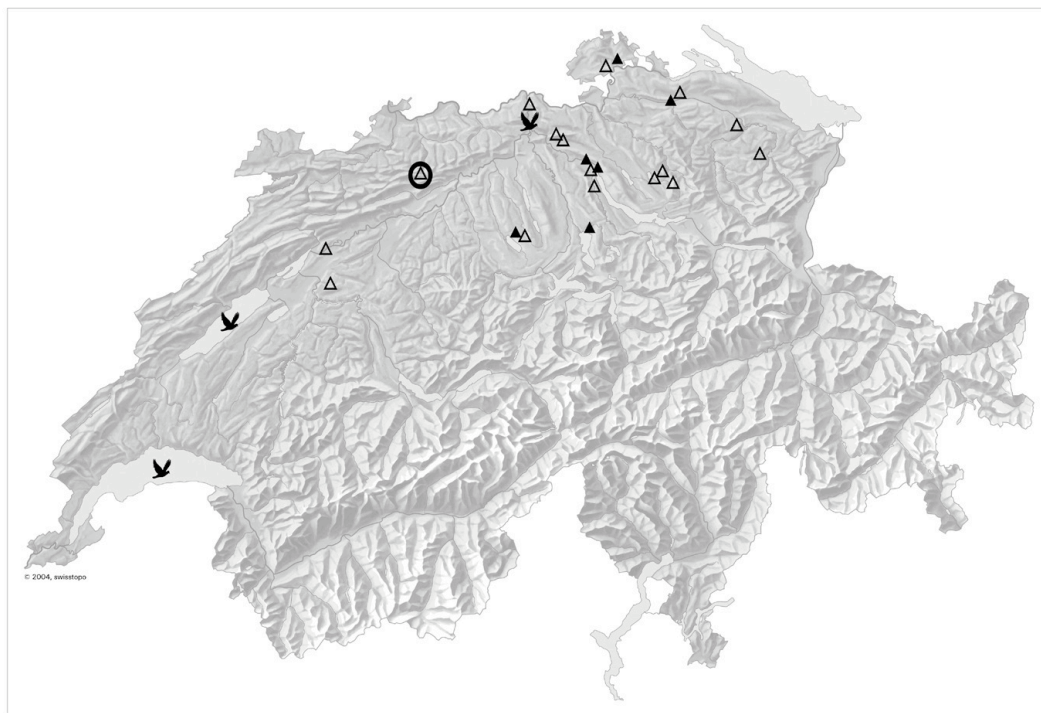
**Abb. 2)** *geographische Verteilung der Proben*

▲ *Organ- und Kotproben*

□ *Kotproben*

○ *Beringungsstation Ulmethöhe*

✈ *Wasservogel- Rastplatz (Klingnauer Stausee, Neuenburgersee, Genfersee)*



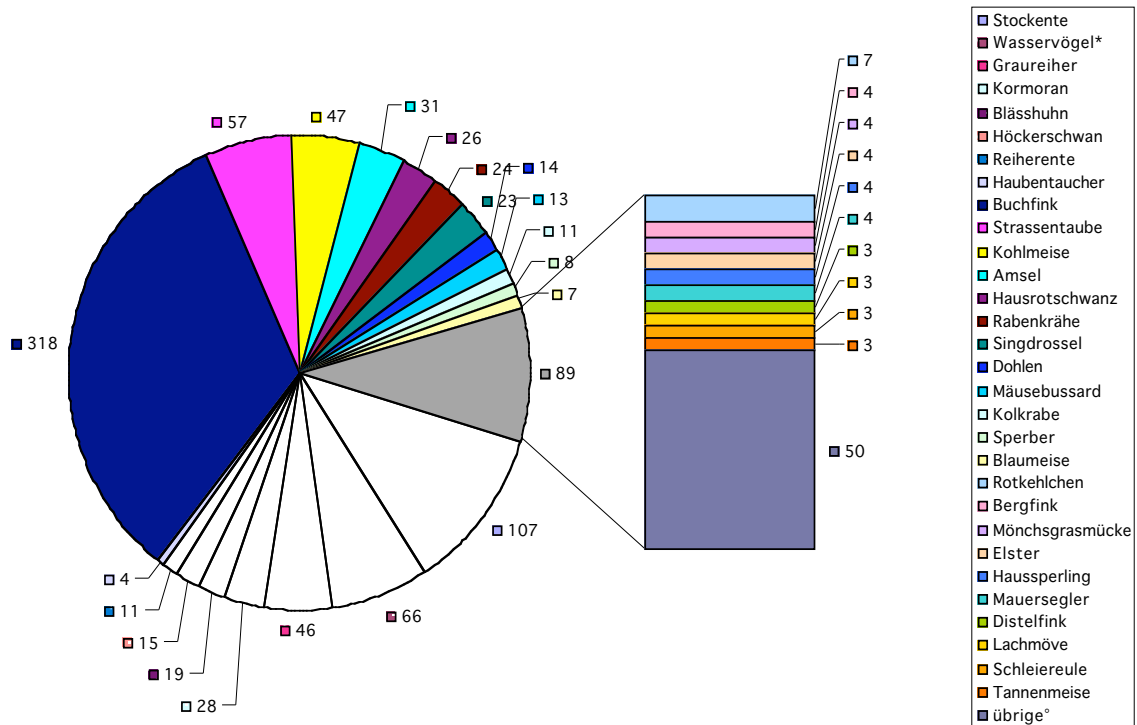
## Material & Methoden

Abbildung 3 zeigt die artspezifische Verteilung der Proben. Die Wasservögel stammten aus den Ordnungen der Anseriformes, der Pelecaniformes, der Ciconiiformes und der Gruiformes.

**Abb. 3) Artspezifische Verteilung der Proben, Wasservögel punktiert hervorgehoben**

\* Kot von nicht bestimmten Wasservogelspezies

°40 weitere Spezies in kleiner Anzahl (davon 12 Spezies Wasservögel)



### C.3. Probenaufbereitung und RNA-Extraktion

Während der Sektion wurden Proben von Milz, Niere, Trachea und Gehirn gewonnen, gepoolt und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Für die RNA-Extraktion wurde das Ultraspec™ RNA Isolation System Kit (AMS Biotechnology, Lugano, Schweiz) verwendet. Dazu wurden 10-20 mg pro Organ in flüssigem Stickstoff schockgefroren, pulverisiert und nach Angaben des Herstellers weiterverarbeitet. Nach der Homogenisierung wurde 1ml Ultraspec™ Reagenz zugegeben und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde 0.2 ml Chloroform zugegeben, 15 Sekunden geschüttelt, fünf Minuten auf Eis gekühlt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 13000 rpm 15 Minuten zentrifugiert (Hettich Universal 30 RF Zentrifuge). Die wässrige Phase, die etwa 4/5 des Volumens ausmachte, wurde umpipettiert und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Nach 10 minütiger Lagerung auf Eis wurde die Probe bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 13000 rpm während 10 Minuten zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde zweimal mit 75% Ethanol gewaschen, dazwischen fünf Minuten mit 7500 rpm zentrifugiert, an der Luft getrocknet und am Schluss in 50  $\mu\text{l}$  Wasser gelöst, das vorgängig mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) nach Angaben des Herstellers (Fluka, Buchs, Schweiz) behandelt wurde.

## Material & Methoden

Die Tupferproben wurden aufgetaut, die Tupfer entfernt und zwei bis drei Proben nach geographischer Herkunft gepoolt. Von diesen Pools wurde 0.75 ml als Ausgangsmaterial für die Extraktion mittels Ultraspec™ RNA Isolation System Kit verwendet, 1 µg carrier RNA (tRNA von E. coli MRE 600 von Roche Pharma, Basel, Schweiz) und gleich verarbeitet wie die Organproben.

### C.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### C.4.1. Vorversuche

Als Screeningmethode wurde eine in einem Schritt (one-step) durchführbare real-time RT-PCR als geeignet erachtet. Gewählt wurde die von van Elden und Mitarbeiter (2001) beschriebene Methode, die folgende für Matrixgensequenzen spezifische Primer verwendet:

Inf A Pro: 5'- GGA CTGCAG CGT AGA CGC TT -3'

Inf A Rev: 5'- CAT CCT GTT GTA TAT GAG GCC CAT -3'

Statt der von van Elden et al. (2001) beschriebenen spezifischen Sonde wurde jedoch SYBR® Green als Fluoreszenzfarbstoff verwendet.

Um die one-step real-time RT-PCR zu etablieren, wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Die Primerkonzentration wurde von 50 nM bis 400 nM variiert und mit einer Temperatur-Gradienten PCR (57.6° C bis 64.5°C) kombiniert. Diese Kombination wurde für die verschiedenen Referenzvirusstämme und das Plasmid optimiert. Der Nachweis der Amplifizierung wurde durch ‚gespikte‘ Proben sichergestellt. Zu diesem Zweck wurde sowohl zu Organ- als auch zu Tupferproben eines serologisch negativ getesteten Huhnes eine bestimmte Menge einer Referenzvirussuspension (200 µl) beigemischt. Danach erfolgte die in C.3. beschriebene Aufarbeitung und RNA-Extraktion. Die RNA wurde in einer 2-er Verdünnungsreihe eingesetzt.

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität der one-step real-time RT-PCR wurde das Plasmid in einer in DEPC Wasser hergestellten Verdünnungsreihe ( $10^{-3}$  -  $10^{-15}$ ) getestet.

Als Zweitmethode wurde die von Starick et al. (2000) beschriebene klassische RT-PCR beigezogen. Diese Methode beinhaltet 3 Schritte, die reverse Transkription, eine erste PCR und zur Erhöhung der Sensitivität eine anschliessende "nested" PCR. Die dazu verwendeten Primer sind ebenfalls spezifisch für Matrixgensequenzen:

Aeussere Primer

IVA- M1: 5'- AGC GTA GAC GCT TTG TC -3'

IVA- M2: 5'- GAC GAT CAA GAA TCC AC -3'

Innere Primer

IVA- M1/1: 5'- ATG GGY CTC ATA TAC AAC AG -3'

IVA- M2/2: 5'- CAG CAC TGG AGC TAG GAT GAG -3'

Durch die äusseren Primer wird ein 600 bp, durch die inneren ein 300 bp Produkt produziert.



## Material & Methoden

Auch diese klassische PCR wurde mit einer Gradienten-PCR (42° C bis 55°C) und verschiedenen Primerverdünnungsreihen optimiert. Die übrigen PCR Bedingungen wurden von Starick et al. (2000) übernommen.

Die Synthese aller Primer erfolgte durch Microsynth GmbH (Balgach, Schweiz). Die lyophilisierten Primer wurden mit DEPC Wasser auf 100  $\mu$ M rekonstituiert und bei –20°C gelagert.

### C.4.2. One-step real-time RT-PCR

Basierend auf den Vorversuchen erwiesen sich die nachfolgend beschriebenen Bedingungen als am besten geeignet.

Ein 50  $\mu$ l Ansatz bestand aus: 25  $\mu$ l iScript™ One-Step RT-PCR Mix with SYBR® Green (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), 1.5  $\mu$ l Inf A Pro Primer (400 nM), 1.5  $\mu$ l Inf A Rev Primer (400 nM), 1  $\mu$ l iScript Reverse Transcriptase for One-Step RT-PCR (Bio-Rad), 6  $\mu$ l DEPC Wasser und 10  $\mu$ l Template.

Das Ansetzen der PCR erfolgte auf Eis, um vorzeitige Reaktionen der Polymerase zu verhindern. Die Durchführung der einzelnen Schritte (Vorbereitung des Mixes, Zugabe des Templates, Amplifizierung) wurden räumlich getrennt durchgeführt, um die Entstehung falsch-positiver Ergebnisse zu verhindern. Für das Pipettieren wurden gestopfte Pipettenspitzen gebraucht. Eine Negativkontrolle (Reaktionsmix mit 10  $\mu$ l DEPC Wasser) und mehrere Positivkontrollen (Reaktionsmix mit 10  $\mu$ l Plasmid-DNA, entsprechend einer Konzentration von 20 pg, und den LPAI Stämmen H4N6, H6N2 und H9N2 in den Verdünnungen 1:30 und 1:60) begleiteten jeden Ansatz.

Vor dem Einfüllen in die Platte wurden die RNA-Proben bei 95° C während 5 Minuten auf einem Heizblock (Thermomix 5436, Eppendorf AG, Hamburg) erhitzt, dann auf Eis gekühlt und möglichst schnell in die Platte pipettiert.

Die Amplifizierung wurde in einem iCycler™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

cDNA Synthese:	50°C, 10 min
RT- Inaktivierung:	95°C, 5 min
PCR- Zyklen: (45x)	95°C, 15 sec 62.5°C, 20 sec 65°C, 70 sec
Schmelzkurven-Analyse:	95°C, 1 min 55°C, 1 min 55°C, 10 sec (80 Zyklen, 0.5 °C Temperaturerhöhung pro Zyklus)

## Material & Methoden

### C.4.3. Klassische RT-PCR

Für die verschiedenen Reaktionsgemische wurden folgende Kits verwendet: Reverse Transcription System<sup>®</sup> und PCR Core System I<sup>®</sup> von der Firma Promega (Catalys AG, Wallisellen, Schweiz).

Aufgrund der Vorversuche wurden folgende Reaktionsansätze verwendet:

RT-Mix: 2  $\mu$ l  $MgCl_2$  (25 mM), 2  $\mu$ l RT Buffer (10x), 2  $\mu$ l dNTP (10mM), 0.5  $\mu$ l RNasin (40 U/ $\mu$ l), 0.7  $\mu$ l AMV-RT (20 U/m $\mu$ l), 1.6  $\mu$ l reverse Primer, IVA-M1 (15  $\mu$ M), 1.2  $\mu$ l DEPC Wasser und mit 10  $\mu$ l Template. Folgende Laufparameter wurden angewendet:

Annealing: 25°C, 10 min

Reverse Transkription: 42°C, 45 min  
99°C, 5 min

Für den PCR-Mix wurden 3  $\mu$ l  $MgCl_2$  (25 mM), 3  $\mu$ l RT Buffer (10x), 0.25  $\mu$ l Taq Polymerase (5 U/ $\mu$ l), 1.6  $\mu$ l forward Primer, IVA-M2 (15  $\mu$ M), 22.15  $\mu$ l DEPC-Wasser und 20  $\mu$ l RT-PCR Produkt gemischt. Die Amplifizierung erfolgte unter diesen Bedingungen:

RT- Inaktivierung: 95°C, 5 min

PCR- Zyklen: (40x) 95°C, 1 min  
50°C, 1 min  
72°C, 1 min

Extension: 72°C, 7 min

Für die Durchführung der nested PCR wurden 49  $\mu$ l des folgenden Mixes mit 1  $\mu$ l des RT-PCR Produktes versetzt: 5  $\mu$ l  $MgCl_2$  (25 mM), 5  $\mu$ l RT Buffer (10x), 0.25  $\mu$ l Taq Polymerase (5 U/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l dNTP (10 mM), 1.6  $\mu$ l forward Primer, IVA-M1/1 (15  $\mu$ M), 1.6  $\mu$ l reverse Primer, IVA-M2/2 (15  $\mu$ M), 33.55  $\mu$ l DEPC-Wasser und wie folgt amplifiziert:

Annealing: 95°C, 3 min

Nested PCR- Zyklen: (30x) 95°C, 30 sec  
50 °C, 30 sec  
72°C, 30 sec

Extension: 72°C, 2 min

Der Nachweis der RT-PCR- und nested PCR-Produkte erfolgte durch 60 minütige elektrophoretische Auftrennung bei 70 V in einem 2 %igen Agarosegel mit Zusatz von Ethidiumbromid (0.3  $\mu$ g/ml Agarose (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Die Produkte wurden in einen Ladepuffer (Orange-loading dye solution; Fermentas, Hanover, MD, USA) aufgenommen. Als Molekulargewichtsmarker diente die ‚Trackit<sup>™</sup> 100 bp DNA Ladder‘ (Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, California, USA).

### **C.5. DNA-Sequenzierung**

Die AIV spezifischen PCR Amplifikate wurden mit dem QUIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (von QIAGEN Inc. Valencia, CA, USA) aus dem Agarosegel aufgereinigt. Die gereinigte DNA konnte anschliessend direkt für die DNA-Sequenzierung verwendet werden.

Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC, Konstanz, Deutschland mittels dem ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Version 3.1) durchgeführt. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit den entsprechenden Sequenzen der in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) enthaltenen Genomabschnitte verglichen.

### **C.6. Anzüchtung auf Bruteiern**

Organmaterial von PCR-positiven Proben wurde auf drei 10 Tage vorbebrütete Eier verimpft. Organstückchen wurden in einem sterilen Mörser mit sterilem Quarzsand gut homogenisiert. Das Homogenisat wurde mit Sörensen-Puffer, der mit Antibiotika versetzt ist (pro Liter 1g Vancomycin, 1 g Streptomycin und 20 mg Garamycin) im Verhältnis von 1:5 gemischt. Pro Ei wurden 0.2 ml des aufgearbeiteten Materials in die Chorio-Allantoishöhle injiziert. Mit den beimpften Eiern wurde wie unter C.1.2. beschrieben, verfahren.

### **C.7. Probenmaterial für die serologische Untersuchung**

Getestet wurden 620 Seren von Legehennen und Rassegeflügel (älter als 25 Wochen) der Serumbank unseres Institutes aus den Jahren 2002 und 2003. Zudem wurden in den Jahren 2004 und 2005 je 20 Blutproben von Masttruten, Mastgeflügel, Lege- und Junghennen von 280 Herden aus Freilaufhaltungen im Schweizer Mittelland in die Untersuchung miteinbezogen. Die Blutproben der Masttieren und der Masttruten wurden beim Schlachttermin entnommen. Gesamthaft wurden 4093 Seren aus 326 Herden getestet.

#### **C.7.1. ELISA**

Sämtliche Seren wurden mit einem indirekten ELISA (Avian Influenza Virus Flockchek<sup>®</sup>; IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA) nach Angaben des Herstellers getestet. Das Prinzip beruht auf der Bildung eines spezifischen Antigen-Antikörper-Komplexes, an den sich ein Enzym-gekoppeltes Konjugat anlagert. Nach Zugabe des Enzymsubstrates und eines Chromogens erfolgt eine Farbentwicklung, die in direkter Korrelation zur Menge von AI-Antikörpern in der Probe steht.

#### **C.7.2. Hämagglutinationshemmungs-Test**

Im ELISA positive Seren wurden im Hämagglutinationshemmungs-Test weiter untersucht, der nach dem OIE Manual durchgeführt wurde (OIE 2004).

Der Hämagglutinationshemmungs-Test wurde mit folgenden Antigenen durchgeführt, um die Subtypen H5 bzw. H7 ausschliessen zu können:

## Material & Methoden

A/chicken/Scotl./59 (H5N1)

A/african starling/England-Q/983/7 (H7N1)

A/turkey/Ontario/77732/66 (H5N9)

Das Prinzip des Hämagglutinationshemmungs-Test (HHT) beruht auf der Hemmung der Bindung von Viren an der Oberfläche von Erythrozyten. Diese Bindung wird verhindert durch spezifische Antikörper. Zur Bestimmung der Hämagglutinationshemmung wurden die Seren in einer 2-fachen Verdünnungsreihe mit einer konstanten Menge 1% Hühnererythrozytensuspension versetzt. Dann wurde die kleinste Serumkonzentration bestimmt, bei der noch eine vollständige Hämagglutinationshemmung zu beobachten war.

## D. Resultate

### D.1. PCR

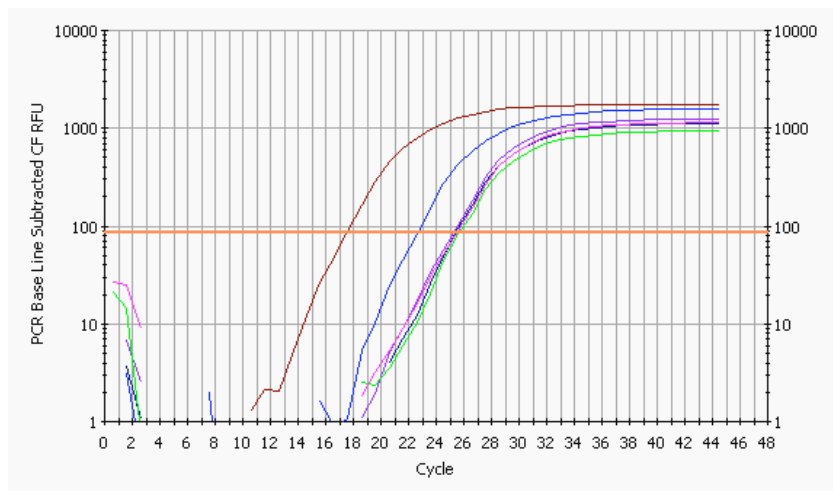
#### D.1.1 One-step real-time RT-PCR

Bei Verwendung von SYBR® Green anstelle einer spezifischen Sonde ist es anhand der PCR Kurven nicht möglich, positive und negative Proben voneinander zu unterscheiden (s. Abb. 4). Für die eigentliche Auswertung muss deshalb die Schmelzkurve beigezogen werden (s. Abb. 5).

Abbildung 4 zeigt einen typischen PCR-Verlauf mit zwei positiven Kontrollen (blau-H9N2; braun-Plasmid), einer negativen Kontrolle (violett-DEPC Wasser) und drei Organproben (dunkelblau, hellgrün und pink).

#### **Abb. 4)** *real-time RT-PCR Kurven*

*Blau: H9N2, Braun: Plasmid, Violett: DEPC Wasser*  
*Dunkelblau, Hellgrün und Pink: Proben (negativ)*



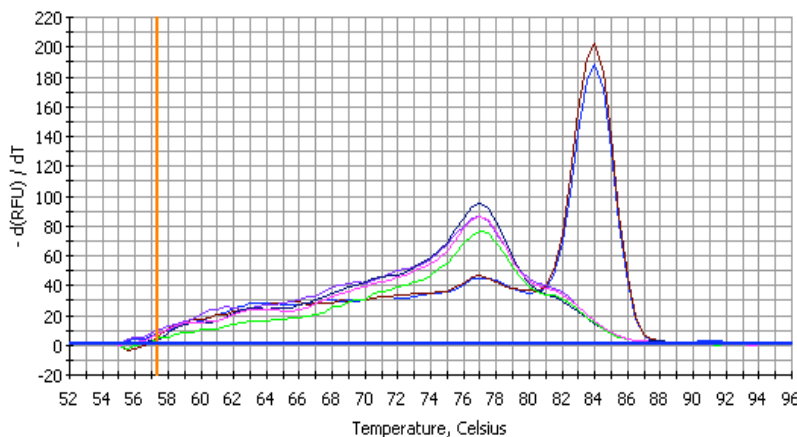
## Resultate

Abbildung 5 zeigt die dazugehörige Schmelzkurve. Nur die positiven Kontrollen entwickeln einen Peak bei 84°C, alle anderen Kurven zeigen einen Peak bei 77°C, was auf eine Primer-Dimer Bildung hinweist. Das bedeutet, dass diese Proben als negativ zu beurteilen sind.

**Abb. 5)** *real-time RT-PCR, Schmelzkurven*

*Blau: H9N2, Braun: Plasmid, Violett: DEPC Wasser*

*Dunkelblau, Hellgrün und Pink: Proben (negativ)*



Die positiven Kontrollen zeigten klare Schmelzkurvenpeaks bei 84°C, eindeutig waren auch die Peaks bei Primer-Dimer Bildung (77°C). Proben, die andere Peaks im Temperaturbereich zwischen 72°C und 94°C zeigten, wurden als fraglich positiv bewertet. Die Nachweisgrenze für das Plasmid lag bei einer Verdünnung von  $10^{-6}$  (entsprechen  $2.1 \times 10^3$  Molekülen). Eine positive Reaktion konnte bei den Viren bis zu einer Verdünnung von 1:128 nachgewiesen werden. Für die ‚gespikten‘ Proben lag die letzte nachweisbare Verdünnung bei derselben Verdünnungs-Stufe. Alle 989 Kloakentupfer und Organproben wurden in der one-step real-time RT-PCR getestet. Davon erwiesen sich 932 Proben als negativ und 57 als fraglich positiv.

### D.1.2. Klassische RT-PCR

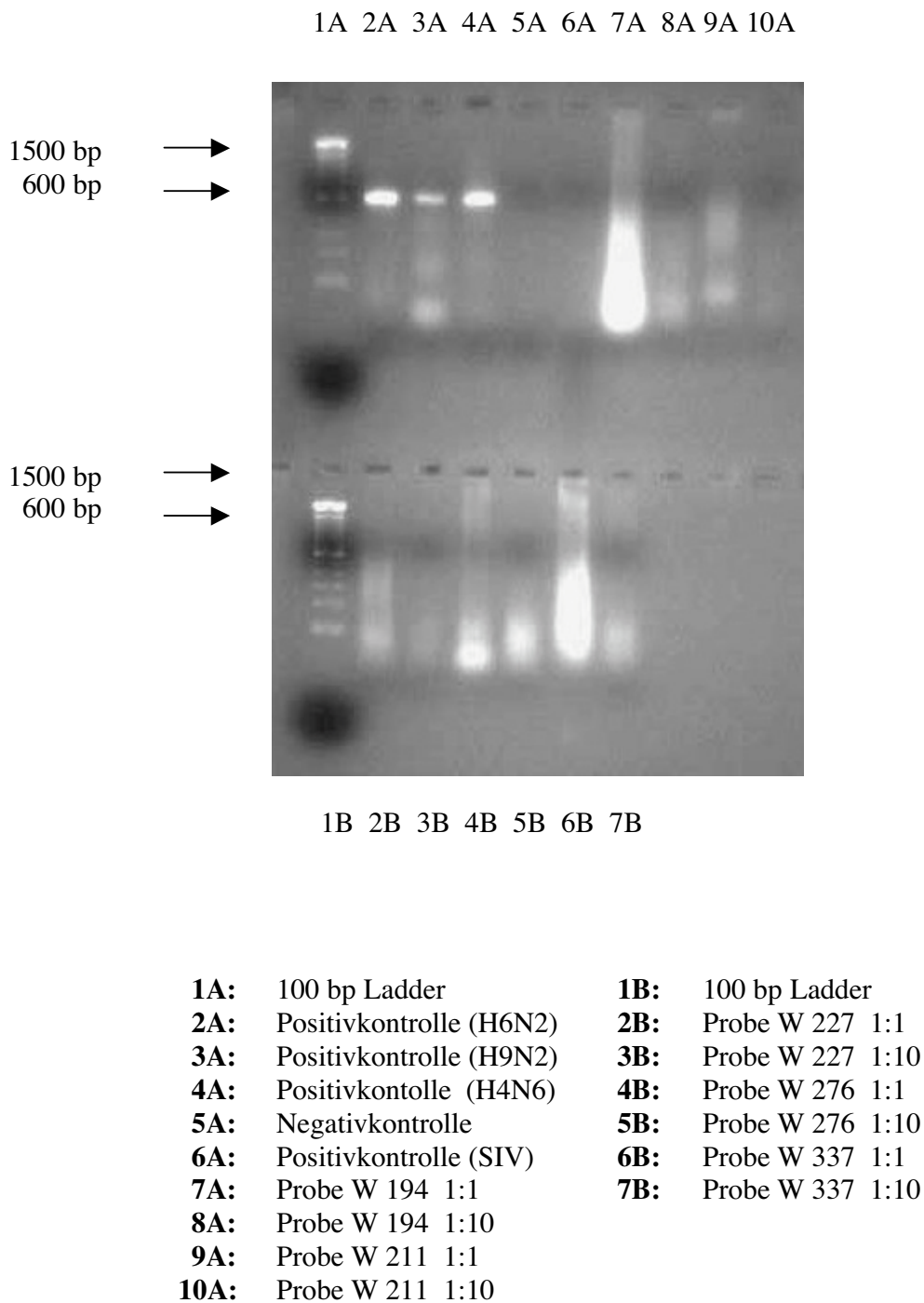
Die in der real-time RT-PCR fraglich positive 57 Proben, deren Schmelzkurvenpeak von den erwarteten 84°C abwich, jedoch nicht jenem einer Primer-Dimer Bildung (77°C) entsprach, wurden in der klassischen RT-PCR nach Starick (2000) getestet. Ein Schweine-Influenzavirus Referenzstamm (SIV) wurde mitgeführt (A/sw/Finistère/2899/82 (H1N1), um die Eignung dieser Methode zum Nachweis von Subtypen anderer Spezies zu zeigen. Die Abbildungen 6 und 7 zeigen fünf dieser Proben.

Das 600 bp RT-PCR Produkt liess sich nur bei den 3 AIV Referenzviren nachweisen (Abb. 6). Das 300 bp nested PCR Produkt wurde, wie erwartet bei den AIV Referenzviren gefunden und zusätzlich bei dem SIV Stamm sowie bei zwei Proben (Abb. 7). Bei Probe W 227 trat die Bande nur in der 1:10 Verdünnung auf, was auf einen Hemmeffekt bei dieser Probe hinweist. Bei den

## Resultate

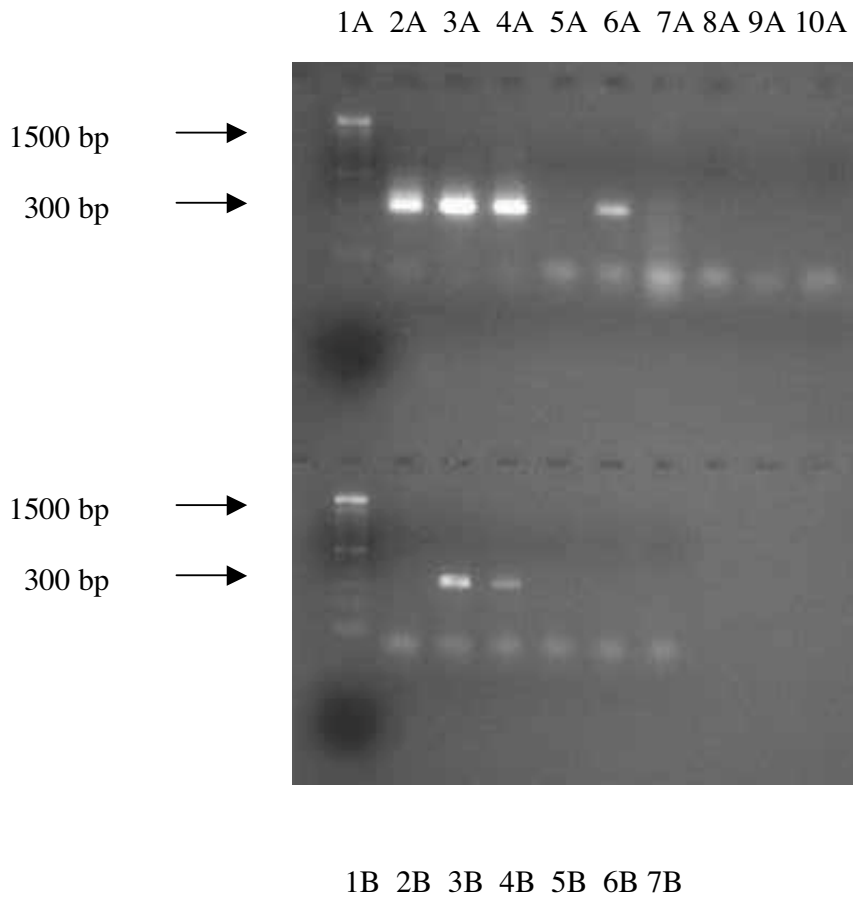
beiden positiven Proben handelte es sich um Organproben von zwei Blässhühnern (*fulica atra*), die als Rallen zu den Ruiformes gehören.

**Abb. 6)** Nachweis von aviären Influenza Virus mittels klassischer RT-PCR, PCR Produkte



## Resultate

**Abb. 7)** Nachweis von aviärem Influenza Virus mittels klassischer RT-PCR, nested PCR Produkte



<b>1A:</b>	100 bp Ladder	<b>1B:</b>	100 bp Ladder
<b>2A:</b>	Positivkontrolle (H6N2)	<b>2B:</b>	Probe W 227 1:1
<b>3A:</b>	Positivkontrolle (H9N2)	<b>3B:</b>	Probe W 227 1:10
<b>4A:</b>	Positivkontrolle (H4N6)	<b>4B:</b>	Probe W 276 1:1
<b>5A:</b>	Negativkontrolle	<b>5B:</b>	Probe W 276 1:10
<b>6A:</b>	Positivkontrolle (SIV)	<b>6B:</b>	Probe W 337 1:1
<b>7A:</b>	Probe W 194 1:1	<b>7B:</b>	Probe W 337 1:10
<b>8A:</b>	Probe W 194 1:10		
<b>9A:</b>	Probe W 211 1:1		
<b>10A:</b>	Probe W 211 1:10		



## Resultate

### D.2. DNA-Sequenzierung

Die nested PCR Produkte von den zwei positiven Proben wurden aus dem Gel extrahiert und von der Firma GATC sequenziert. Die in der NCBI Datenbank durchgeführte BLAST-Analyse (Altschul et al., 1997) zeigte folgende Homologien:

Probe W 227 zeigte eine 92% Homologie mit Influenza A Virus (A/pintail/Alberta/113/85 (H6N2)). Die Probe W 276 war zu 94% homolog mit Influenza A Virus (A/ruddy turnstone/Delaware/244/91 (H5N2)), mit Influenza A Virus (A/mallard/Alberta/297/77 (H10N7)), mit Influenza A Virus (A/ruddy turnstone/Delaware/142/99 (H3N2)) und Influenza A Virus (A/mallard/Alberta/211/98 (H1N1)).

### D.3. Anzüchtung auf Bruteiern

Es wurde ein Homogenisat aus dem Organpool der zwei positiven Proben hergestellt und in 10 tägige Bruteier inokuliert. Nach beider Passagen wurde ein Hämagglutinationstest durchgeführt. Er war für beide Proben negativ.

### D.4. Serologische Untersuchung

#### D.4.1. ELISA

Insgesamt wurden 4093 Seren von Tieren aus 282 Beständen mit Freilandhaltung im ELISA getestet. Davon waren 140 (3.4%) Proben aus 87 Herden positiv. In 69 Herden gab es ein ELISA positives Tier (24.4 %). Nur in 3 Herden gab es mehr als 5 positive Fälle (1.7%).

#### D.4.2. Hämagglutinationshemmungs-Test

Im ELISA positive Seren wurden zusätzlich im Hämagglutinationshemmungs-Test geprüft. Von den positiven Proben erreichten 5 (0.1%) im HHT einen Titer von  $\geq 1:16$ .

**Tabelle 2:** Resultate Serologie

	Blutproben/Herde <sup>1</sup>	ELISA pos./Herde <sup>2</sup>	HHT pos./Herde <sup>3</sup>
<i>Junghennen</i>	189/17	4/2	1/1
<i>Mastgeflügel</i>	2284/143	76/45	1/1
<i>Legehennen</i>	520/48	12/9	2/2
<i>Masttruten</i>	622/39	28/16	0
<i>Rassegeflügel</i>	478/35	20/15	1/1

<sup>1</sup> Anzahl Blutproben/ Anzahl Herden

<sup>2</sup> positiver ELISA/ Anzahl positiver Herden

<sup>3</sup> positiver Hämagglutinationshemmungs-Test/ Anzahl positiver Herden

## **E. Diskussion**

### **E.1. PCR**

Für die Amplifizierung aviärer Influenza Viren wurde die von van Elden und Mitarbeitern (2001) beschriebene real-time RT-PCR etabliert. Mit der Wahl dieser Methode, die humanmedizinisch etabliert ist, wurde ein erster Schritt zur Harmonisierung der Labormethoden im Bereich des schweizerischen Netzwerks Influenza gemacht. Die real-time RT-PCR nützt Primersequenzen, die an konservierte Regionen des Matrixproteingens binden und damit ein breites Spektrum an Influenza A Virus Subtypen erfassen. In dieser Methode wird jedoch eine Sonde eingesetzt, die spezifisch ist für eine Region zwischen den Primerbindungsstellen, die sich als eher variabel herausgestellt hat. In Vorversuchen (nicht beschrieben) zeigte sich, dass mit dieser spezifischen Sonde nicht alle Referenzviren detektiert werden konnten. Deshalb wurde SYBR® Green gewählt, ein Fluoreszenzfarbstoff, der unspezifisch an die ‚minor groove‘ des DNA-Doppelstranges bindet. SYBR® Green hat den Vorteil, dass ein grösseres Spektrum an Subtypen abgedeckt wird. Der Test wird dadurch jedoch deutlich weniger sensitiv als mit einer spezifischen Sonde. Deshalb erforderte der Einsatz von SYBR® Green bei unklaren Resultaten einen Bestätigungstest.

Die RT-PCR von Starick et al. (2000) wurde als Bestätigungstest gewählt, da sie dank einer nested PCR die Sensitivität des Nachweises erhöht. Besonders der Nachweis von LPAI Viren wird mit dieser Methode verbessert (Starick & Werner 2003).

Die real-time RT-PCR hat gegenüber der Virusanzüchtung im Brutei den Vorteil, dass sie bedeutend weniger Zeit braucht. Eine Probe kann innerhalb eines Arbeitstages verarbeitet werden. Diese Methode eignet sich gut für grosse Probenzahlen. Gleichzeitig wird das Infektionsrisiko des Untersuchers verringert, da bei der RNA-Extraktion das Virus schon im ersten Schritt inaktiviert wird.

Zu den Vorteilen der real-time RT-PCR gegenüber der klassischen RT-PCR zählen die Geschwindigkeit, die geringe Gefahr der Kreuzkontamination und der Verzicht auf das Agarose Gel zum Nachweis von Produkten (Spackman et al., 2003).

Trotz des Nachteils einer geringeren Sensitivität hat sich die one-step real-time RT-PCR als Screeningmethode als geeignet erwiesen, erfordert aber die Überprüfung von fraglichen Resultaten mit einem sensitiveren, jedoch aufwendigeren Test. Die zu diesem Zweck ausgewählte klassische RT-PCR, deren Sensitivität durch eine nested PCR erhöht wird, hat allerdings den oben genannten Nachteil der Kontaminationsgefahr. Diese kann aber durch gezielte Massnahmen, wie zum Beispiel strikt getrennte Bearbeitungsräumlichkeiten, konsequent eingehaltene Hygienemassnahmen minimiert werden.

Die Tatsache, dass aus Organmaterial der positiven Proben kein Virus isoliert werden konnte, zeigt, dass die PCR die Methode der Wahl für ein Überwachungsprogramm ist. Es ist darauf hinzuweisen, dass das Matrixgen des Influenzavirus wenig geeignet ist, um eine Subtypisierung durchzuführen. Zu diesem Zweck müssen PCR Methoden, die Subtypen-spezifische Primer verwenden, eingesetzt werden. Dies kann mit den in einem Screeningtest positiven Proben auch nachträglich durchgeführt werden.

Beim Einsatz von Organ- und Tupferproben sind verschiedene Aspekte zu berücksichtigen, um höchste Testempfindlichkeit zu erzielen. Die Lagerung der Proben sollte gekühlt erfolgen, nach Möglichkeit bei  $-70^{\circ}\text{C}$ . Vor allem Gefrier-Tauschritte müssen vermieden werden. Die Probengewinnung war in dieser Hinsicht suboptimal, da es im Feld nicht immer möglich war, die

## Diskussion

Proben sofort bei  $-70^{\circ}\text{C}$  einzufrieren. Ein weiterer wichtiger Punkt ist der Zeitpunkt, an dem die Proben gewonnen werden. Je nach Jahreszeit kann die Prävalenz von AIV-Infektionen bei Stockenten zwischen 1% im Winter und 30% im Spätsommer/Herbst variieren. Besonders empfänglich sind dann die Jungtiere, die sich bei adulten Ausscheidern infizieren (Globig et al., 2004).

932 getestete Proben waren in der real-time RT-PCR eindeutig negativ. 57 Proben waren fraglich positiv und wurden deshalb mit der klassischen RT-PCR nach Starick überprüft.

Zwei Proben waren positiv. Es waren Organproben von zwei Blässhühnern (*fulica atra*). Insgesamt wurden 20 Blässhühner in dieser Studie getestet. Das bedeutet, dass 10% der getesteten Blässhühner positiv waren. Die Anzahl der getesteten Blässhühner ist jedoch im Verhältnis zur Gesamtzahl der Proben klein (2%). Ein Blässhuhn stammte aus der Region Zürich, das andere aus Hünenberg (ZG). Beide waren männlichen Geschlechts und wurden Mitte Januar, bzw. Anfang Februar 2004 zur Sektion eingesandt. Ein Virusanzüchtungsversuch auf embryonierten Hühnereiern ergab ein negatives Resultat. Der Verlust der Infektiosität durch die Lagerung der Proben ist bekannt (Spackman et al., 2003).

Die Resultate der Sequenzierung und der anschliessenden BLAST-Analyse zeigten Homologien bis maximal 94%. Die beschriebenen Subtypen, welche die grössten Homologien mit den untersuchten Proben zeigten, stammen alle aus Kanada, was aber in Anbetracht der niedrigen Homologie, vorsichtig zu beurteilen ist. Andere H10 Subtypen wurden in Wildvögeln und Straussen in Südafrika und in Mastgeflügel in England isoliert (Alexander 2003).

In Italien untersuchten de Marco und Mitarbeiter in einer Studie von 1992-1998 neben Stockenten auch 449 Blässhühner und fanden bei letzterer Spezies eine Seroprävalenz von 7.1%. Die seropositiven Tiere zeigten Antikörper ausschliesslich gegen H3 und H10 Subtypen (de Marco et al., 2004). Daneben konnten 22 Viren aus Wasservögeln isoliert werden und zusätzlich wurden zwei seropositive Raubvögel gefunden; Sperlingsvögel und Hühnerartige zeigten ein negatives Resultat (de Marco et al., 2003).

Fouchier und Mitarbeiter konnten 2003 in einer Untersuchung von Wildvögeln in Nordeuropa in Möven, Seetaucher, Enten und Gänsen in 1% der Proben das AI-Virus nachweisen (Fouchier et al., 2003). Ottis und Bachmann untersuchten zwischen 1977 und 1980 über 3000 Wildvögel in Deutschland, Holland und Kenya und konnten 69 Influenza A Viren isolieren (2%) (Ottis und Bachmann 1983). In Deutschland wurden in den Jahren 2003-2004 aus 2528 Kloaken- und Rachentupfer von 74 verschiedenen Vogelarten 21 AIV isoliert. Die meisten Isolate stammen von migrierenden Enten (Stock- und Krickenten) an der Nord- und Ostseeküste. Es konnte auch ein Isolat von einer Teichralle, einer Dohle und einer Möve gewonnen werden. Alle Isolate waren von geringer Pathogenität. Das Isolat der Teichralle war ein H10 Subtyp (Globig et al., 2004). Ryll und Mitarbeiter hat 543 Singvögel auf Helgoland untersucht und konnte kein AI-Virus nachweisen (Ryll et al., 2003). Bei einer serologischen Untersuchung von Kormoranen in Frankreich konnten keine Antikörper gegen Influenza A Viren nachgewiesen werden (Artois et al., 2002). Stallknecht & Shane (1988) konnten Viren vor allem in Wasservögeln nachweisen (Prävalenz 10.9%) und die Isolierungen aus Vogelarten, die nicht zur Enten- bzw. Gänsefamilie gehören, waren viel geringer (2.1%).

Diese Studien zeigen, dass es sich vor allem lohnt, in Wasservogelpopulationen nach AIV zu suchen. Am interessantesten im epidemiologischen Zusammenhang sind vor allem die Rastgebiete ziehender Wasservögel. In der Schweiz sind dies der Klingnauer Stausee, der

## Diskussion

Neuenburger- und der Genfersee (Abb. 2). Die Schweiz beherbergt im Winter viele Wasservögel aus dem Norden, die auf den offenen Gewässern genügend Nahrung finden, um zu überwintern. Das Probenmaterial unserer Studie bestand zu 32.5% aus Wasservögeln, die übrigen Proben stammten von Singvögeln. Ein zukünftiges Überwachungsprogramm in der Schweiz sollte sich vor allem auf die Wasservögel fokussieren. Die EU empfiehlt für ein Surveillance Programm je 30% Wasser- und Küstenvögel und 40% andere Wildvögel zu testen (EU working document SANCO 2002).

### E.2. Serologie

Im aktuellen Überwachungsprogramm der europäischen Union werden zehn Blutproben pro Herde getestet, um eine Seroprävalenz von 30% nachweisen zu können (95% Wahrscheinlichkeit). In unserer Studie war der Probenumfang im vergleichbaren Rahmen (mindestens zehn Blutproben pro Herde).

Als Screeningverfahren wurde der Flockcheck ELISA von IDEXX verwendet, der in der Diagnostik häufig eingesetzt wird (de Wit et al., 2004).

3.4% der Blutproben von Jung- und Legehennen, Mastgeflügel, Masttruten und Rassegeflügel waren im ELISA positiv und nur 0.51% zeigten auch im HHT ein positives Resultat. Die Tiere, die im ELISA positiv und im HHT negativ waren, hatten keine Antikörper gegen H5 und gegen H7, sondern wahrscheinlich gegen einen anderen Subtyp (LPAI). Dafür spricht auch, dass alle positiven Tiere klinisch unauffällig waren. Die Suche nach LPAI in den Geflügelbeständen ist wichtig, da LPAI Viren längere Zeit zirkulieren können (Capua et al. 2003). Nur in drei Herden waren mehr als 5 Proben positiv. Hier wäre eine Nachkontrolle sinnvoll gewesen. Im ELISA stellten die teils recht stark hämolytischen Seren ein Problem dar, das zu falsch positiven Resultaten führte.

Die Masttruten (4.5%) wie auch das Rassegeflügel (4.1%) waren im Vergleich zu den anderen Gruppen (2.5%) häufiger ELISA positiv. Im Falle der Truten lässt sich dies durch die höhere Empfänglichkeit für das Virus erklären (Campitelli et al., 2004). Rassegeflügel wird in der Schweiz häufig zusammen mit Wasserziergeflügel gehalten, was die Virusübertragung erleichtert. Schon in früheren Studien wurden in der Schweiz 3% seropositive Reagenten bei Rassegeflügel nachgewiesen (Wunderwald et al., 2002).

Durch vermehrte Freilandhaltung des Geflügels vergrössert sich die Gefahr der Übertragung von AIV aus dem Virusreservoir der Wildvögel auf Wirtschaftsgeflügel. In einer früheren Befragung von Geflügelhaltern in der Schweiz wurden Spatzen und Krähen in den Ausläufen gesehen, und Greifvögel in der näheren Umgebung der Hühner beobachtet (Gohm et al., 1999). In der gleichen Studie wurde auf die Gefahr des möglichen illegalen Importes von Bruteiern oder geimpften Tieren beim Rassegeflügel aufmerksam gemacht.

Zanella et al. (2001) vermuten, dass Hinterhofhaltung und Wildvögel zur Aufrechterhaltung und Verbreitung von LPAIV einen Beitrag leisten. Problematisch wird es vor allem dann, wenn ein Betrieb mit Freilandhaltung in der Nähe der Zugvogelroute oder eines bedeutenden Rastplatz liegt.

In einem zukünftigen Überwachungsprogramm wäre es angebracht, solche Betriebe schwerpunktmässig zu beproben.

## **F. Zusammenfassung**

Ausbrüche von klassischer Geflügelpest in Geflügelbetrieben im europäischen Ausland in den letzten Jahren zeigten, dass auch die Schweiz ein Surveillance-Programm braucht. Für diesen Zweck wurden in der vorliegenden Arbeit zwei in der Literatur beschriebene PCR-Protokolle zum Nachweis von aviärem Influenza Virus etabliert.

Die one-step real-time RT-PCR wurde wegen der schnelleren Durchführung und dem besseren Handling als Screening Methode gewählt.

Getestet wurden Organe (Gehirn, Milz, Niere und Luftröhre) und Kloaken- bzw. Kottupfer von 989 Wildvögeln, die zu 72 verschiedenen Arten gehören.

Von den 989 getesteten Proben waren 932 in der one-step real-time RT-PCR negativ. 57 (5.7%) waren fraglich positiv. Diese wurden in einer klassischen RT-PCR getestet. Zwei dieser Proben waren in der nested PCR positiv. Sie stammten von Blässhühnern (*fulica atra*).

4093 Seren aus 39 Masttruten-, 143 Mastgeflügel-, 35 Rassegeflügel-, 48 Lege- und 17 Junghennenherden von 282 Beständen mit Freilandhaltung wurden in einem kommerziellen genusspezifischen ELISA getestet. 140 (3.4%) Seren aus 87 Herden waren positiv. Ein Hämagglutinationshemmungs-Test wurde durchgeführt, um Antikörper gegen H5 und H7 Subtypen ausschliessen zu können. 5 (0.1%) der 140 ELISA-positiven Seren waren im Hämagglutinationshemmungs-Test positiv. In den getesteten Geflügelherden ergaben sich somit keine Anhaltspunkte für zirkulierende H5 und H7 Subtypen des aviären Influenza Virus.

## G. Summary

Recent outbreaks of avian influenza in poultry in the European Community showed the necessity of a Swiss surveillance program. For this purpose two different AIV PCR protocols were established.

The real-time RT-PCR was used as screening method due to the better handling and quicker processing.

Samples of brain, spleen, kidney and trachea as well as cloacal and fecal swabs of 989 wild birds belonging to 72 different species were tested.

932 samples were negative in the one-step real-time RT-PCR, 57 samples were doubtful. These were retested in a classical RT-PCR. Two samples were positive in the nested PCR. Both samples originated from coots (*Fulica atra*).

4093 serum samples out of 282 free-range flocks were examined with a commercial ELISA for AI. They originated from 143 broiler, 65 layer, 39 turkey and 35 fancy flocks from dense poultry areas in Switzerland. 140 sera (3.4%) from 87 flocks were positive. A hemagglutination inhibition test excluded antibodies against H5 and H7 virus subtypes. 5 (0.1%) from the ELISA positive sera were positive in the hemagglutination inhibition test. This serological study demonstrates that no H5 or H7 virus subtypes are circulating in the tested flocks.

## H. Literaturverzeichnis

- Alexander, D. J.: The history of avian influenza in poultry, World Poultry Special Edition, 7-8, Nov. 2000.
- Alexander, D. J.: Report on avian influenza in the eastern hemisphere during 1997-2002, Avian diseases, 47, 792-797, 2003.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Research, 25, 3389-3402, 1997.
- Artois, M., Manvell, R., Fromont, E., Schweyer, J.-P.: Serosurvey for newcastle disease and avian influenza A virus antibodies in great cormorants from France, Journal of Wildlife Diseases, 38(1), 169-171, 2002.
- Campitelli, L., Mogavero, E., De Marco, M. A., Delogu, M., Puzzelli, S., Frezza, F., Facchini, M., Chiapponi, C., Foni, E., Cordioli, P., Webby, R., Barigazzi, G., Webster, R. G., Donatelli, I.: Interspecies transmission of an H7N3 influenza virus from wild birds to intensively reared domestic poultry in Italy, Journal of Virology, 323, 24-36, 2004.
- Capua, I., Mutinelli, F., Dalla Pozza, M., Donatelli, I., Puzelli, S., Cancellotti, F. M.: The 1999-2000 avian influenza (H7N1) epidemic in Italy: veterinary and human health implications, Acta Tropica, 83, 7-11, 2002.
- Capua, I., Marangon, S., dalla Pozza, M., Terregino, C., Cattoli, G.: Avian influenza in Italy 1997-2001, Avian diseases, 47, 839-843, 2003.
- De Marco, M. A., Foni, E., Campitelli, L., Raffini, E., Delogu, M., Donatelli, I.: Long-term monitoring for avian influenza viruses in wild bird species in Italy, Veterinary research communications, 27 Suppl. 1, 107-114, 2003.
- De Marco, M. A., Campitelli, L., Foni, E., Raffini, E., Barigazzi, G., Delogu, M., Guberti, V., Di Trani, L., Tollis, M., Donatelli, I.: Influenza surveillance in birds in Italian wetlands (1992-1998): is there a host restricted circulation of influenza viruses in sympatric ducks and coots?, Veterinary Microbiology, 98, 197-208, 2004.
- De Wit, J. J., Koch, G., Fabri, T. H. F., Elbers, A. R. W.: A cross-sectional serological survey of the Dutch commercial poultry population for the presence of low pathogenic avian influenza virus infections, Avian pathology, 33(6), 565-570, 2004.
- Elbers, A. R. W., Kamps, B., Koch, G.: Performance of gross lesions at postmortem for the detection of outbreaks during the avian influenza A virus (H7N7) epidemic in The Netherlands in 2003, Avian pathology, 33(4), 418-422, 2004.
- EU working document SANCO/10140/2002: Guidelines for avian influenza surveillance programs in poultry and wild birds to be applied in member states 2002/2003.
- Fouchier, R. A. M., Olsen, B., Bestebroer, T. M., Herfst, S., Van der Kemp, L., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D. M. E.: Influenza A virus surveillance in wild birds in northern europe in 1999 and 2000, Avian Diseases, 47, 857-860, 2003.
- Globig, A., Starick, E., Werner, O.: Untersuchung von Wildvögeln auf aviäre Influenza- und Paramyxoviren, Tagung der Fachgruppe Geflügelkrankheiten, 67. Fachgespräch, Hannover 2004.
- Gohm, D., Schelling, E., Audigé, L., Thür, B.: Newcastle Krankheit- seroepidemiologische Untersuchung einer hochansteckenden Tierseuche beim Geflügel und bei Wildvögeln in der Schweiz, Schweizer Archiv für Tierheilkunde, 141, 549-588, 1999.
- <http://europa.eu.int/eur-lex>

## Literaturverzeichnis

- <http://www.oie.int>, Highly pathogenic avian influenza  
<http://www.promedmail.org>  
<http://www.cdc.gov/flu/avian>  
OIE, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, chapter 2.1.14., avian influenza, 5th edition, 2004.  
Ottis, K., Bachmann, P. A.: Isolation and characterization of ortho- and paramyxoviruses from feral birds in europe, Zentralblatt für Veterinär Medizin B, 30, 22-35, 1983.  
Perroncito, E.: Epizootia tifoide nei gallinacei. Annali Accademia Agricoltura Torino 21, 87-126, 1878.  
Rott, R.: Influenza, eine besondere Form einer Zoonose, Münch. Tierärztliche Wochenschrift, 110, 241-246, 1997.  
Ryll, M., Schnebel, B., Dierschke, V., Zinke, A.: Risikosabschätzung von ziehenden Kleinvögeln als Vektoren aviärer Influenza A und Paramyxoviren vom Rastplatz Helgoland, Proceedings von der 14. Tagung über Vogelkrankheiten, München 2003.  
Spackman, E., Senne, D. A., Bulaga, L. L., Myers, T. J., Perdue, M. L., Garber, L. P., Lohman, K., Daum, L. T., Suarez, D. L.: Development of real-time RT-PCR for the detection of avian influenza virus, Avian diseases, 47, 1079-1082, 2003.  
Swayne, D. E.: The history of avian influenza in poultry, World Poultry Special Edition, 4- 6, 2000.  
Starick, E., Römer-Oberdörfer, A., Werner, O.: Type- and subtype-specific RT-PCR assays for avian influenza A viruses, Journal of veterinary medicine B, 47, 295-301, 2000.  
Starick, E., Werner, O.: Detection of H7 avian influenza virus directly from poultry specimens, Avian Diseases, 47, 1187-1189, 2003.  
Stallknecht, D. E., Shane, S. M.: Host range of avian influenza virus in free-living birds, Vet. Re. Commun., 12, 125-141, 1988.  
Van Elden, L. J. R., Nijhuis, M., Schipper, P., Schuurmann, R., Van Loon, A. M.: Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR, Journal of clinical microbiology, 39 (1), 196-200, 2001.  
Werner O., Globig, A.: Zum Vorkommen von aviären influenza Viren bei Geflügel in verschiedenen Haltungformen in Deutschland, Tagung der Fachgruppe Geflügelkrankheiten, 67. Fachgespräch, Hannover 2004.  
Wunderwald, C., Hoop, R. K.: Serological monitoring of 40 swiss fancy breed poultry flocks, Avian Pathology, 31, 157-162, 2002.  
Zanella, A.: Avian influenza strikes Italy's poultry industry again, World Poultry, 19, 30-31, 2003.  
Zanella, A., Dall'Ara, P., Martino, P. A.: Avian influenza epidemic in Italy due to serovar H7N1, Avian Diseases, 45, 257-261, 2001.



## ***Danksagung***

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hoop für die Überlassung des Themas, die stets gewährte Unterstützung und die schnelle Korrekturarbeit.

Frau PD Dr. Engels für die Übernahme des Koreferates und die Einführung in die Welt der Molekularbiologie.

Frau Margrit Kreienbühl, Frau Désirée Morger, Frau Vreni Mrosek, Frau Roswitha Keller für die Unterstützung bei den Sektions- und Laborarbeiten.

Herrn Matthias Kestenholz von der Vogelwarte Sempach und den Mitgliedern des BNV für die tatkräftige Unterstützung beim Probensammeln.

Den Herren Ulmann, Kistler, Staub, Gering, Steven und Hohler für die freundliche Mitarbeit.

Frau Homberger von der Vogelpflegestation Beringen und den Mitarbeitern des Tierheims Pfötli für die Mithilfe beim Probennehmen.

Frau Eva Löpfe und allen Mitarbeitern des Institutes für Veterinärvirologie für ihre praktischen Tipps und Hilfeleistungen.

Allen Mitarbeitern der Zootierklinik, die beim Probensammeln mitgeholfen haben.

Frau E. Starick vom Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems, Deutschland für die fachliche Unterstützung.

Den Herren Wunderli und Thomas vom Centre National de l'influenza in Genf, Schweiz, für die Möglichkeit, ihnen über die Schulter zu schauen und die zahlreichen guten Ratschläge.

Barbara Bürge-Litzenberger, Christine Sudler, Priska Affolter, Cordia Wunderwald und allen Mitarbeitern des NRGK für die fachliche und moralische Unterstützung.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und Aufmunterung während dieser Zeit.

## ***Lebenslauf***

Name Anette Monika Baumer

Geburtsdatum 20.9.1976

Geburtsort Münsterlingen

Nationalität Schweizerin

Heimatort Schaffhausen

1983 – 1989 Primarschule Tägerwilen

1990 – 1992 Sekundarschule Tägerwilen

1992 - 1996 Kantonsschule Kreuzlingen

1996 Mittelschulabschluss, Maturität Typ B

1996 – 2002 Studium der Veterinärmedizin an der Vetsuisse Fakultät Bern, Schweiz

2002 Staatsexamen an der Vetsuisse Fakultät Bern, Schweiz

2003 - 2005 Dissertation am Institut für Veterinärbakteriologie der Vetsuisse Fakultät Zürich, Schweiz

9.6.2005